蝴蝶蘭新品種與種苗量產整合技術開發

陳福旗、金石文、李鎮宇、吳宣萱、黃雅文、黃建誌

國立屏東科技大學農園系

摘要

蝴蝶蘭為我國重要旗艦產業之一，其種苗年出口值已達新台幣30億元以上。新品種研發為國內產、官、學各界之強項，而組織培養種苗生產技術則為新品種量產所必備工具。優良商業品種、品系或原種利用雜交授粉，可創造出各種新奇花形、花色、市場需求規格之新品系。本研究團隊近年育成迷你多花型、中輪花、大唇等之新品系，已授權業界進行量產。國內組培業多半提供自家公司種苗量產所需，另有少數小規模業者為專業代工組培服務。為提供組培量產技術與新創業者，或既存業者擬改善提升組培能力，本團隊近五年已經開發出數個關鍵組培技術，包括成熟種子無菌播技術，可縮短育種時程及提升效率、花梗芽誘導及種苗量產技術、擬原球體誘導及增殖技術。由於國際市場競爭，種苗開花特性須符合需求，因此另開發多梗誘導技術，可供帶梗苗出口，提升銷售通路及效益。大唇辦品種為近年被開發具新穎性蝴蝶蘭類型，透過大唇之雜交育種，了解其遺傳控制機制，可提升育種效率。本團隊亦已找出關鍵調控基因，其特殊表現模式造成大唇發育，已獲得智財局審核通過專利申請。

前言

蝴蝶蘭為我國旗艦農產品之一，其種苗及開花株出口值近年快速增加，2014年之出口值達1億3389萬美元(行政院農業委員會)，為各類蘭花出口之冠。種苗之生產有賴高效率組織培養技術，利用花梗節培養形成多芽體，並進一步增殖量產幼小植株(young plantlets)，亦可利用誘導擬原球體(protocorm-like body, PLB)並大量增殖，亦可於短期間量產。花梗之來源為固定品種或經選拔新品種，於開花期切取其花梗已進行組培。近年本研究團隊針對市場需求，利用各種優良種原進行雜交育種，選育出多個中、小輪蝴蝶蘭新品系，包括新興花形如大唇瓣之新品系，已陸續授權業界。新品種之育成，有賴無菌播種與實生苗培育，因此本團隊亦針對組織培養量產技術、成熟種子無菌播種技術，以及多花梗誘導技術，進行整合開發，並授權予蘭花產業界利用。

蝴蝶蘭新品種研發

由於全球景氣持續處於低迷狀態，蝴蝶蘭之國際市場高度競爭，雖然每年數量需求均有成長，然拍賣販售單價逐年降低。如能於單位面積栽培生產較多種苗，其獲利可以增加，尤其以 6、9 公分盆徑之品種之周轉率較高，相對利潤亦可增加，因此為市場成長較快速之種類。本團隊針對此種市場需求，訂定育種目標: 1. 迷你多花型品種育成，可供 6 或 9 公分盆生產。2. 中輪花，具各式花色或花型(包括大唇瓣品系)。3.新品系必須產生雙梗、開花株高度適中，單梗需具分叉性。4. 其他特性新品系，如香味、特殊花色，為達此目標，可利用各種蝴蝶蘭原生種，或近緣屬種原間雜交。

育種親本之自各蘭園生產之品種中收集，經判別具有優良之園藝特性者，陸續收集並進行雜交授粉。目前已收集之重要品種包括: *Phalaenopsis* Sogo Vivien ‘F858’、*P*. Liu’s Twilight Rainbow ‘F2006’、*P*. Timothy Christopher、*P*. Cassandra、*P*. Little Gem Stripes ‘Champion’、*P*. Rainbow Chip ‘F1970’、*P*. Purple Martin、*P*. Sogo Charm ‘F1473’、*P*. Sogo Genki ‘F1984’、*P*. Rothschildiana、*P*. Sogo Shito、*P*. Sogo Meili ‘F1751’、*P*. Sunrise Red Peoker、*P*. Brother Spring Dancer ‘KHM190’、*P*. World Class、*P*. Yu Pin Fireworks、*P*. Sogo Yukidian ‘V3’、*P*. Fusheng Pink Pearl 等。另外可能利用到之原生種亦加以收集，包括 *P. aphrodite*、*P. sanderiana*、*P. equestris*、*P. bellina*、*P. amboinensis*、*P. lindenii*、*P. pallens*、*P. venosa* 等，初代種間雜交種由原種間互交選育，或購買瓶苗自行培育，例如 *P*. Silbergrube (*P. equestris* x *P. celebensis*)。圖 1 顯示一些育種親本或原種之花朵型態。

蝴蝶蘭之雜交授粉，常易發生雜交不親合，以致無法順利結實，雜交障礙之致因複雜，其中減數分裂產物配子之否為正常之四分子，可初步據以判別親本之稔性(fertility)。藉由分析一些朵麗蝶蘭(*Doritaenopsis*，目前分類上已統一歸為蝴蝶蘭屬 *Phalaenopsis*)之小孢子型態分布(sporad type)，可知四分子比率高之品種，授粉後產生種子的比率亦較高(表 1，引用自 Bolaños-Villegas et al., 2008)，母本雌配子母細胞之減數分裂，大孢子約在授粉後 40-55 天產生(Niimoto & Sagawa, 1962)，在授粉後約 80 天，胚珠形成(Nadeau et al., 1996)，因此要判別減數分裂是否正常，在蝴蝶蘭利用雄蕊分析較為方便(Bolaños-Villegas & Chen, 2007; Bolaños-Villegas et al., 2008)。由四分子分析結果另得知蝴蝶蘭花粉減數分裂產物有不減數配子(unreduced gametes)，其配子染色體數為兩套以上，可供多倍體育種用途，為提高不減數配子比率，可利用適當化學藥劑處理(Hsu et al., 2010)。組織培養過程需在培養基添加植物生長調節劑，亦可能發生多倍體化現象，以流式細胞儀(flow cytometer)可以分析確認母本及倍數體化之變異株(圖 2)。

截至目前為止，本團隊已授權 16 個小花新品系、6 個中大輪新品系(表 2)，另有三個新品系授權簽約中。其中 NPU4 品種權正申請中。

種苗量產整合技術開發

蝴蝶蘭組織培養主要以花梗節進行試管扦插，待長出芽體後，進行切割增殖，

此種芽長芽之增殖(shoot multiplication)方式，為業界普遍採用。然而新投入之蘭花或組培業者，往往無法掌握關鍵技術，我們經由探討培養基、植物生長調節劑、芽體切割等方式，發展出一套種苗量產技術(吳　等，2008a, 2008b, 2009)，再經過微細調整配方，已授權業界使用。另一種組培量產技術為誘導擬原球體(protocorm-like-body, PLB)，再進一步增殖，唯過去文獻發表所使用的培殖體包括綠色葉片、無菌播種發芽之原球體，這些科學研究不適合利用於商業繁殖，因此必須如何利用營養系繁殖(clonal propagation)概念，使增殖量產之種苗維持穩定性，同兼顧增殖倍率。由比較試管芽體之綠色葉片或白化葉片細胞倍數體差異，得知綠色組織具有不同倍數體，因此可利用白化芽體葉片誘導擬原球體並進一步增殖(許、陳，2003)。生長點培養應用在許多農、園藝作物之組織培養種苗量產，然而蝴蝶蘭之生長點培養研究極少，通常均利用花梗節誘導形成之較大芽體進行增殖研究。我們嘗試將不帶葉原體之生長點培養於最適化培養基，可於約三個月後誘導出擬原球體，並利用於增殖量產，繁殖倍率可大為提高，亦可利用於篩選無病毒種苗，此技術已移轉給多家業者使用。

蝴蝶蘭優良品種的來源為育種後代單株選拔，再進行花梗節培養。雜交受粉後，待果實發育至將近成熟，仍維持綠色時，業界即採收以委託或自行播種，通常播種密度高、種子發育成熟度不足，因此實生苗培育效率普遍不高，此外綠莢播種有傳播病毒之風險，本團隊經多年試驗及觀察，研發出一套成熟種子無菌播種技術，其發芽效率及實生苗成長速度快，因此可以縮短育種時程，此技術已授權業界。

結論

品種研發永無止境，隨者市場變化及消費者需求，需要隨時修正育種目標，並收集具有適當園藝特性之種原，以創造新奇且具商業特性之新品種。花朵型態突變種除了可供遺傳分析其控制機制外，可能具有應用價值，例如大唇瓣品種，最早由夏威夷蘭園發現於 *P.* World Class 族群中發現一株唇瓣突變為花瓣之大唇品系‘Big Lip’，已造成新奇花形之育種風潮，我們由蝴蝶蘭突變種轉錄體分析(Huang et al., 2015)，找到一個調控基因 AGL6，其與花瓣之分化可能相關，其應用目前已獲中華民國專利保護(陳　等，2015)。蝴蝶蘭育種與組織培養種苗量產研發成果最終期望可供產業應用，在這些研發過程所附帶產生的一些突變材料，透過學理的分析，了解其變異之致因，除所衍生之分子標記應用外，未來將可更精準地改善組織培養技術、提高育種選拔效率。

參考文獻

陳福旗、黃建誌、李鎮宇、鄭汀琦、金石文. 2015. 與蘭科植物花形調控有關的

基因. 中華民國專利發明第 I480287.

許家嘉、陳福旗. 2003. 以蝴蝶蘭白化葉片誘導擬原球體與植株再生. 中國園藝 49(4):335-342.

吳宣萱、陳福旗. 2008a. 蝴蝶蘭與朵麗蝶蘭花梗芽之誘導與刻傷處理對芽體增殖之影響. 台灣園藝 54(1):67-74.

吳宣萱、陳福旗. 2008b. 植物生長調節劑對蝴蝶蘭與朵麗蝶蘭花梗芽增殖之影響. 台灣園藝 54(2):151-159.

吳宣萱、滕民強、陳福旗. 2009. 培養基添加物及光質對蝴蝶蘭及朵麗蝶蘭芽體誘導不定根之影響. 台灣園藝 55(2):127-135.

Bolaños-Villegas P., and F.C. Chen. 2007. Cytological identification of chromosomal rearrangements in *Doritaenopsis* and *Phalaenopsis*. J. Intl. Coop. 2(1):1-11.

Bolaños-Villegas P., S.W. Chin, and F.C. Chen. 2008. Meiotic chromosome behavior and capsule setting in *Doritaenopsis* hybrids. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 133(1):107-116.

Hsu S.C., T.C. Cheng, P. Bolaños-Villegas, S.W. Chin, and F.C. Chen. 2010. Pollen meiotic behavior in relation to *Phalaenopsis* breeding. Acta Hortic. 878:139-144.

Huang, J.Z., C.P. Lin, T.C. Cheng, Bill C.H. Chang, S.Y. Cheng, Y.W. Chen, C.Y. Lee, S.W. Chin, and F.C. Chen. 2015. A de novo floral transcriptome reveals clues into Phalaenopsis orchid flower development. PLOS ONE 10(5): e0123474.

Nadeau J.A., X.S. Zhang, Li J., and S.D. O'Neill 1996. Ovule development: identification of stage-specific and tissue-specific cDNAs. Plant Cell 8:213-239.

Niimoto D.H., and Y. Sagawa. 1962. Ovule development in *Phalaenopsis*. Caryologia 15:89-97.

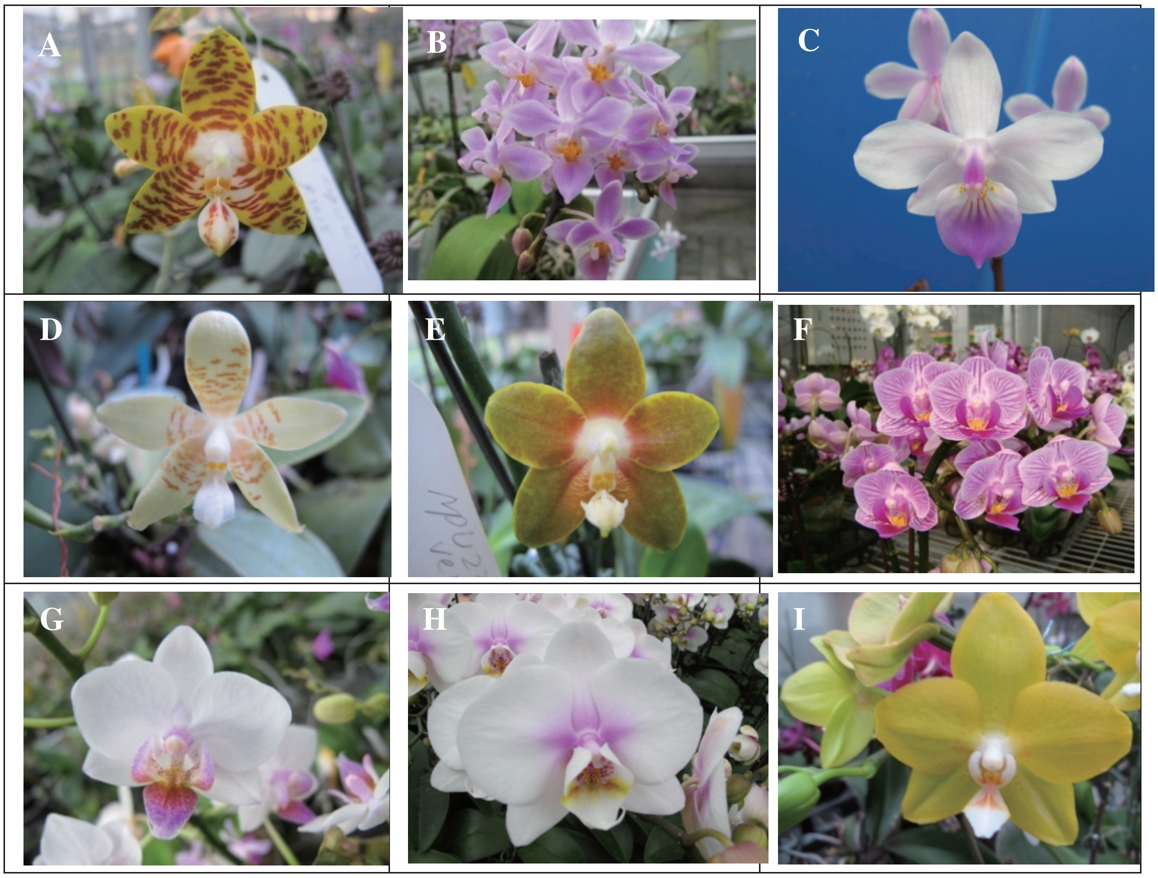

圖 1. 一些原種及雜交種親本之花朵型態

Fig. 1. Floral morphology of some *Phalaenopsis* species and breeding parents

A, *Phal. amboinensis*；B, *Phal. equestris*；C, *Phal. lindenii*；D, *Phal. pallens*；E, *Phal. venosa*；F, *Phal*. Sogo Vivien ‘F858’；G, *Phal*. Liu’s Twilight Rainbow ‘F2006’；H, *Phal*. Sogo Genki ‘F1984’；I, *Phal*. Sogo Meili ‘F1751’.

表 1. 數種朵麗蝶蘭及蝴蝶蘭小孢子頻率分布

Table 1. Distribution of sporad types for several *Doritaenopsis* and *Phalaenopsis* orchids

Hybrid/species	PMCs						
	Monad	Dyad	Triad	Tetrad	Tetrad + 1mc*	Tetrad + 2mc	Tetrad +3 or more mc
P. equestris	3	0	9	928	47	6	7
Dtps. Chian-Huey Red Rose 'F904'	12	7	18	835	108	17	3
Dtps. Jiuhbao Red Rose	19	27	50	607	226	43	28
Dtps. Purple Gem	34	5	6	568	306	52	29
Dtps. Fuchsia Princess 'KHM648'	5	63	140	516	201	33	42
Dtps. Sogo Gem 'F1082'	115	304	76	244	23	7	221
Dtps. I-Hsin Purple Jewel	12	56	99	225	200	129	279
Dtps. Sogo Gem 'F752'	127	241	219	182	53	18	56
Dtps. Bin You Danseuse 'F574'	241	63	56	56	18	17	590
Dtps. Sogo Gem 'F859'	15	16	12	15	5	30	907

* mc = micronucleus

The total scoring number per individual sample is 1000 pollen mother cells (PMCs).

Hybrids are shown in descending order according to the frequency of tetrads observed.

(Source: Bolaños-Villegas et al., 2008)

表 2. 屏東科技大學歷年移轉授權蝴蝶蘭雜交品系

Table 2. New breeding lines of *Phalaenopsis* hybrids licensed by NPUST.

花徑 Flower size	代號 Designation	授權年份 Year licensed
小花 Miniature	NPU2	99
	NPU4	97
	NPU104	104
	NPU313	100
	NPU342	100
	NPU1398	102
	NPU1410	102
	NPU1886	103
	NPU1934	103
	NPU1939	103
	NPU2021	103
	NPU2410	103
	NPU2631	104
	NPU2654	104
	NPU2882	104
	NPU3117	104
中大輪 Medium to Large flower	NPU3	98
	NPU343	100
	NPU2075	103
	NPU2629	104
	NPU2630	104
	NPU2903	104